Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof.Dr.Deinhardt

EXTRAZELLULÄR SEZERNIERTE PROTEINE BETA-HÄMOLYSIERENDER STREPTOKOKKEN. VERSUCH EINER ANALYSE MITTELS ENZYMATISCHER UND ELEKTROPHORETISCHER VERFAHREN.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Fr. Weber

aus
Kirchentellinsfurt

1982

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof.Dr.Deinhardt

EXTRAZELLULÄR SEZERNIERTE PROTEINE BETA-HÄMOLYSIERENDER STREPTOKOKKEN. VERSUCH EINER ANALYSE MITTELS ENZYMATISCHER UND ELEKTROPHORETISCHER VERFAHREN.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Fr. Weber

aus
Kirchentellinsfurt

1982

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G.Schierz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F.Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

"So paradox es dem Laien erscheinen mag, so wäre es nach den bisherigen Erfahrungen doch eine völlig unbegründete Behauptung, die Existenz pathogener und septogener Fermente mit dem Geruch diagnosticiren zu können."

(Dr.Th.Billroth u.Dr.F.Ehrlich: Untersuchungen über Coccobacteria septica.Arch.klin.Chir.20(1877)403)

Gliederung

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Bakterienstämme	4
2.2.	Präparation der Exotoxin-Konzentrate	4
2.3.	Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von	6
2.3.1.	DNAse	6
2.3.2.	NADase	7
2.3.3.	Streptokinase (Sk)	8
2.3.4.	Streptolysin O (SLO)	9
2.3.5.	Hyaluronidase (Hyase)	9
2.4.	Auftrennung der Exotoxin-Konzentrate mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	11
2.5.	Auftrennung der Exotoxin-Konzentrate mittels Isoelectrofocusing	13
2.6.	Proteinbesimmung im Exotoxin-Konzentrat	15
2.6.1.	Folin-Reaktion in der Modifikation nach LOWRY	
2.6.2.	Test-Set der Fa.Bio-Rad in der Modifikaion nach BRADFORD	
3.	Ergebnisse	16
3.1.	zu 2.2.:Präparation der Exotoxin-Konzentrate	16
3.2.	Enzymatische Aktivitäten von DNAse,NADase,Sk, SLO und Hyase im Exotoxin-Konzentrat	16
3.3.	Auftrennung und Darstellung der Exotoxin-Konzentrate in der SDS-PE	21
3.4.	Auftrennung und Darstellung der Exotoxin-Konzentrate im I.E.F.	22
3.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
4.	Diskussion	31
5.	Zusammenfassung	37
6.	Literaturverzeichnis	39

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0033

Herkunft der Stämme:

	Chirurgische Wunden	Rachen-abstriche	Urinkultur
Gruppe A:	22815	37636	22526
	38287	40158	
	23503		
	23618		
	23731		
	20090		
	23980		
Gruppe B:	8171	3868	8601
	11949	38625	11051
	484		
	22722		
	3274		
	23003		
	7492		
	23466		
	23943		
	36208		
	3117		
Gruppe G:	14911	16906	14420
	15092	32863	3090
	17586	23122	37597
	15042	22180	
	25237	31155	
	5712	35880	
	36717	24983	
	4651		

Gruppe C: Str.equisimilis: 25903 , 27345 , 27340
Str.dysgalactiae: 2200 , 12168
Str.zooepidemicus: 26466 , 29216 , 13000

Abkürzungen:

Amper : Ammoniumperoxodisulfat-Lösung

B.A. : Blut-Agar

DATD : N,N'-Diallyltartratdiamid

DNAse : Streptodornase

Hyase : Hyalüronidase

I.E.F.: Isoelectrofocusing

NADase: Diphosphopyridinnukleotidase

SDS-PE: Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Sk : Streptokinase

SLO : Streptolysin O

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

THB : Todd-Hewitt-Bouillon

Firmenverzeichnis:

Amicon GmbH , Postfach 1103 , 5810 Witten

Behringwerke AG , 3550 Marburg (Lahn)

Bio-Rad Laboratories GmbH , Dachauerstr.364 , 8000 München-50

LKB Produkter AB , Box 305, S-161 25 Bromma 1 (Schweden)

Millipore GmbH , Siemensstr.20, 6078 Neu-Isenburg

Oxoid LTD, 20 Southwork Bridge Road , London S.E. 1

in Deutschland: Nährböden und Chemie GmbH,Postfach 262
4320 Wesel

Serva Feinbiochemica GmbH u.Co.,Postfach 105260, 6900 Heidelberg

Sigma Chemie GmbH München, Am Bahnsteig 7, 8028 Taufkirchen

1. Einleitung

Streptokokken sind grampositive, kugelige bis ovale, in Ketten gelagerte Kokken. Sie können für Mensch und Tier pathogen sein. Bei den Krankheitsbildern, die sie beim Menschen verursachen, handelt es sich um lokale wie auch generalisierte Prozesse. Klassische Streptokokkeninfektionen sind lokale Infektionen nach Verletzung, Phlegmonen, Impetigo, Erysipel, Tonsillitis, Otitis, Nebenhöhlenaffektionen, Osteomyelitis beim Säugling, Endokarditis, Puerperalsepsis und Scharlach. Hinzu kommen immunologisch bedingte Nachkrankheiten wie Glomerulonephritis und rheumatisches Fieber.(52)
Die Einteilung der Streptokokken erfolgt zunächst nach ihrem Hämolysevermögen in unvollständig- oder vergrünend-(α), vollständig-(β) und nicht-(γ) hämolysierende Streptokokken.(23)
Die beta-hämolysierenden Streptokokken werden nach ihrer antigenen Struktur bezüglich des C-Kohlenhydrats nach LANCEFIELD(27) serologisch in Gruppen von A bis Q weiter unterteilt. Das C-Kohlenhydrat ist ein Zellwandbestandteil von Streptokokken, das durch Extraktion des Kultursediments mit heißer HCl, salpetriger Säure oder Formamid bzw. durch enzymatische Lyse der Zellen mit Pepsin oder Trypsin gewonnen werden kann. LANCEFIELD gelang eine spezifische Gruppeneinteilung mit Hilfe zweier Reagenzien: a. Durch Behandlung der Bakterien mit heißer HCl wurde ein Antigen-Extrakt hergestellt. b. Kaninchen wurden mit Formalinbehandelten Kulturen zur Antikörperbildung angeregt. Stimmten Antigen-Extrakt und Spezifität des Immunserums bezüglich der Serogruppe überein, erfolgte eine Präzipitation. Dabei ergab sich, daß für die serologische Spezifität des C-Kohlenhydrats ein Aminozucker bestimmend ist, so z.B. das Rhamnose-N-Acetylglukosamin für die Serogruppe A .
Mittels der Gruppenzugehörigkeit können Aussagen über die Pathogenität gegenüber bestimmten Wirtsspezies gemacht werden. So sind Streptokokken der Gruppen A,B,C,D,F,G,H,K und L für den Menschen pathogen. Die Mehrzahl der invasiven, beta-hämolysierenden und menschenpathogenen Streptokokken gehört zur Gruppe A,B,C und G , die Gruppe B hat sich insbesondere im Zusammenhang mit Neugeboreneninfektionen als humanpathogen erwiesen.(52)

Die Serogruppe A kann auf Grund von verschiedenen Proteinantigenen, die ebenfalls Zellwandbestandteile sind, in M-,T- und R-Typen unterteilt werden.(52)
Für medizinische Zwecke ist eine Einteilung der Streptokokkken nach ihrer Pathogenität entscheidend. Maßgebliche Pathogenitätsfaktoren sind aber nicht nur die Zellwandbestandteile wie die M-Proteine mancher Stämme, sondern auch die extrazellulären Stoffwechselprodukte der einzelnen Streptokokkenstämme (20,24). Unter den zahlreichen extrazellulären Produkten, die von Streptokokken gebildet werden, sind die Streptokinase, die Streptodornase(DNAse), die Hyaluronidase, die Diphosphopyridinnukleotidase (NADase), das erythrogene Toxin und die Hämolysine Streptolysin O und S besonders zu erwähnen (58). Mit Ausnahme des Streptolysin S besitzen alle diese Produkte Antigenität,d.h.,daß sie im Wirtsorganismus die Synthese spezifischer Antikörper induzieren.
Streptokinase überführt Plasminogen menschlichen Serums in Plasmin, ein aktives proteolytisches Enzym, das Fibrin und andere Proteine verdaut. Tierversuche deuten darauf hin, daß Streptokinase in Gegenwart menschlichen Plasminogens die durch Streptokokken verursachten Schädigungen verschlimmmert(10,49,58). Therapeutisch wird Streptokinase bei arteriellen und venösen Verschlußkrankheiten eingesetzt.
Hyaluronidase besitzt die Fähigkeit, Hyaluronsäure als wichtigen Bestandteil des Bindegewebes zu spalten. Obwohl die Streptokokkenhyaluronidase durch Experimente an der Kaninchenhaut als "spreading factor" beschrieben wordenist(11), besteht noch Unklarheit darüber,ob die Ausbreitung von Streptokokken im Gewebe unter natürlichen Bedingungen durch die Hyaluronidase begünstigt wird(25).
Der NADase wird die Fähigkeit eines Keimes, Leukozyten abzutöten, zugesprochen (52).
Die Hämolysine SLO und SLS besitzen die Eigenschaft, Erythrozyten zu zerstören. SLO wirkt außerdem kardiotoxisch und zerstört Lysosomen. SLS zeigt toxische Wirkung auf Leukozyten und vernichtet ebenfalls Lysosomen(50).
Bei der Streptodornase (DNAse)sind vier immunologisch unterscheidbare Enzyme bekannt (17,57). Die DNAsen B und D haben dabei ebenfalls Ribonuklease-Aktivität (17). Therapeutisch werden DNAsen zur Verflüssigung

von Exsudaten verwendet.
Das erythrogene Toxin ist für das Scharlachexanthem verantwortlich . Zur Zeit sind drei verschiedene Toxine (A,B,C) bekannt(24). Sie werden nur von lysogenen Streptokokkenstämmen produziert.

Serologisch diagnostische Untersuchungen bei Streptokokken-Infektionen lassen Unterschiede erkennen, die mit einer quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Toxinproduktion erklärt werden können. Diese Unterschiede scheinen von Bedeutung für den Krankheitsverlauf zu sein. Daraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit, welche methodischen Möglichkeiten geeignet sind, beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppen A,B,C und G nach ihrer Toxinproduktion zu charakterisieren.

Unter den methodischen Möglichkeiten, die Toxine nachzuweisen und Toxinmuster der einzelnen Stämme zu erstellen, wurde zunächst der enzymatische Nachweis von DNAse,NADase,Streptokinase,Streptolysin O und Hyaluronidase ausgewählt. Anschließend kamen mit der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und dem Isoelectrofocusing im Agarose-Gel zwei physiko-chemische Verfahren zur Anwendung, wobei mit der SDS-PE die Toxine nach ihrem Molekulargewicht, mit dem I.E.F. nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt wurden .

Folgende prinzipielle Einschränkungen müssen gemacht werden:
Es kann nicht davon ausgegangen werden, daß die Toxinproduktion eines Stammes in vivo der in-vitro-Produktion entspricht. Die Abhängigkeit des Wachstums und der Toxinproduktion vom Nährmedium und den Inkubationsbedingungen ist erwiesen (42).
Der Nachweis von Toxinen und deren Charakterisierung sind wesentlich von der angewandten Methode abhängig. Das bedeutet, daß Befunde über die Toxinproduktion immer nur in einem speziellen und nach Möglichkeit standardisierten System Gültigkeit und Aussagekraft haben können.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

Präpariert und untersucht wurden die Enzyme bzw.Exotoxine von 54 Stämmen beta-hämolysierender Streptokokken, darunter 10 Stämme der Gruppe A, 15 B-, 8 C-, 18 G-Stämme, sowie 3 nicht-typisierbare Stämme. Die Streptokokkenstämme der Gruppen A,B und G wurden aus Rachen und Wundabstrichen sowie aus Urinkulturen gewonnen und dem bakteriologischen Diagnostiklabor des M.v.Pettenkofer-Instituts entnommen. Die Streptokokkenstämme der Gruppe C wurden uns freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie/Streptokokkenzentrale in Kiel zur Verfügung gestellt.
Die Gruppenbestimmung der Stämme war zuvor in einer Studie mit 300 Stämmen durchgeführt worden(34). Im Rahmen der Studie wurde überprüft, inwieweit der Streptex-Test, der Phadebact-,der CAMP-, der Bacitracin-Test, die Co-Agglutinationsmethode, die FA(fluoreszierende Antikörper)-Technik und die Präzipitationsmethode nach Lancefield als Referenzmethode in ihren Aussagen zur Differenzierung der Stämme übereinstimmen (27,31,36,38).
Die Ergebnisse dieser Studie deckten sich weitgehend mit den Ergebnissen von Arvilanni, Patterson und Hafeez/Stoner (3,32,43). Zusätzlich wurden alle Stämme vom Institut für Mikrobiologie in Kiel differenziert.

2.2. Präparation der Exotoxin-Konzentrate

Die zu untersuchenden Streptokokkenstämme wurden in THB mehrmals passagiert. Aus der THB wurde der Stamm jeweils auf eine B.A.-Platte überimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.
Nach der Inkubation wurden je 5 Kolonien des Stammes vom B.A. in 4 THBs à50 ml überimpft. Diese THB wurde zuvor in Dialysierschläuchen, deren Ausschlußgrenze bei einem Mol.Gew.von 10000 bis 20000 D liegt,gegen A.dest.zwecks Entfernung makromolekularer Bestandteile dialysiert. Die beimpften THBs wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert (1).

Die inkubierten THB-Kulturen wurden anschließend mit 3500 U/min. für 30 Minuten zentrifugiert, stark schleimproduzierende Kulturen mußten zusätzlich mit 10000 U/min. nachzentrifugiert werden. Die Sedimente der Kulturen wurden auf B.A. überimpft, um die Reinheit der Kulturen zu kontrollieren.

Die Überstände wurden dann mit Spritze und aufgeschraubten Spritzenfiltern (Porengröße 0,22 um) sterilfiltriert.
Das sterile Filtrat wurde auf B.A. ausgestrichen, um die Sterilität zu kontrollieren.

Das Sterilfiltrat wurde in einer gerührten Ultrafiltrationszelle zunächst einer kontinuierlichen Dialyse gegen A.dest. mit 2,5 kp/cm^2 Druck unterzogen, um das Filtrat für die später folgenden Untersuchungen möglichst von allen Salzen zu befreien. Bei vollständig permeierenden Substanzen wie Salzen mußte für eine 95%ige Dialyse mit dem 3-fachen Ausgangsvolumen dialysiert werden, bei 180 ml Ausgangsvolumen also mit 540 ml .
Es wurden Membranfilter mit einer Ausschlußgröße von 10000 D verwendet.
Danach wurde das dialysierte Sterilfiltrat in der gerührten Ultrafiltrationszelle unter einem Druck von 2,5 kp/cm^2 von 180 ml auf 5 ml eingeengt und weiter in Absorptionskammern gefüllt und über ein Membranfilter hygroskopisch von 5 ml auf 0,3 ml eingeengt, anschließend bei -20°C eingefroren.
Der endgültige Einengungsfaktor beträgt ca. 600 .

Materialien:

THB von Oxoid^R (Zusammensetzung auf 100 ml bezogen: 10,0 g fettfreier Rindfleischextrakt, 20,0 g Trypton, 2,0 g Dextrose, 2,0 g NaCl, 2,0 g $NaHCO_3$, 0,4 g Na_2HPO_3).
Visking-Dialysierschläuche 36/32 (Porendurchmesser 15-20 Å , Ausschlußgrenze 10-20000 D) von Fa.Serva .
Spritze und Millex^R-GS-Filter (Porengröße 0,22 um) von Fa.Millipore S.A. .
Gerührte Ultrafiltrationszelle (Modell 202,Volumen 200 ml), Diaflo^R-Ultrafilter PM 10 (Ausschlußgrenze 10000 D), Minicon^{TM}-B-Konzentratoren von Fa.Amicon .

2.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von DNAse, NADase, Streptokinase, Streptolysin O und Hyaluronidase.

In allen Tests wurden sowohl ein ca.600fach eingeengtes Sterilfiltrat des Überstandes als auch ein lediglich sterilfiltrierter Überstand des jeweiligen Stammes untersucht. Außerdem wurde in jedem Test eine Exoenzympräparation des Stammes H 46 A der Behring-Werke mitgeführt*.

2.3.1 Bestimmung der DNAse-Aktivität

Testprinzip:

Zur Anwendung kam eine Modifikation des Tests nach TIESLER (44,46,45). DNAse spaltet DNA, wobei das im Komplex mit DNA lösliche Toluidinblau nach der Spaltung der DNA ausfällt.

Reagenzien:

Aus dem Testsatz der Behring-Werke zur Bestimmung des Anti-DNAse-B-Titers: Lyophilisiertes DNA-Toluidinblau-O-Substrat, Imidazol-Pufferlösung (pH 7,8) und lyophilisierte Streptokokken-DNAse B (30 E/ml) als Vergleichsstandard.

Durchführung:

In cup 2-12 einer Mikrotiterplatte wurden 25 ul des Imidazol-Puffers vorgegeben. 50 ul der Proben bzw. des Standards wurden in cup 1 gegeben, 25 ul davon in cup 2 usw.bis cup 12 überpipettiert. Daraus resultierte eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 .

In jeden cup der Platte wurden 50 ul DNA-Toluidinblau-O-Substrat pipettiert, gut gemischt und anschließend für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Platte erneut gut gemischt und für 10 Min.bei 2000 U/min. zentrifugiert, um das Ablesen der Präzipitation zu erleichtern.

Beurteilung:

Die blaue Präzipitation auf den Mikrotiterplatten wurde über einer beleuchteten Milchglasscheibe abgelesen. Die Aktivität wurde vergleichend zum Standard (DNAse B, 30 E/ml) errechnet.

* Das Präparat wurde uns freundlicherweise von der Fa. Behring in Marburg zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Bestimmung der NADase-Aktivität

Testprinzip:

Der Test wurde in einer Modifikation nach TIESLER durchgeführt (30,47). NAD wird in einer gekoppelten Reaktion unter Mitwirkung von Alkohol und Alkoholdehydrogenase zu NADH umgewandelt, das durch seine starke Fluoreszenz bei 340 nm nachgewiesen werden kann. Bei Vorgabe von NADase zeigt sich Fluoreszenz nur dann, wenn die NADase-Aktivität nicht mehr ausgereicht hat, die NAD zu zerstören.

Reagenzien:

Aus dem Testsatz der Behring-Werke zur Bestimmung des Anti-Streptokokken-NADase-Titers: NAD (5 umol/l), ADH (400 E/ml), Pufferlösung 1 (Sörensen-Puffer mit Konservierungsmittel Na-Azid, 1 mg/ml, pH 7,3) , Pufferlösung 2 ($Na_4P_2O_7 \times 10H_2O$ 0,2 mol/l, Äthanol 20 ml/l, Semicarbazid-Hydrochlorid 1 g/l, Natriumazid 1 mg/ml, pH 9,0), Streptokokken-NADase (500 E/ml).

Durchführung:

Aus Puffer 1 und BSA (Rinderserum-Albumin) wurde ein 1%iger BSA-Puffer hergestellt. Je 50 ul BSA-Puffer wurden in cup 1-12 einer Mikrotiterplatte gegeben. Cup 1 wurden 50 ul der 1:50 verdünnten Proben zugesetzt und 50 ul in cup 2 usw.bis cup 12 überpipettiert. Die Standard-NADase wurde lediglich 1:5 vorverdünnt, die Verdünnungsreihe wurde wie oben angelegt.
In jeden cup wurden danach 25 ul BSA-Puffer und 25 ul NAD-Lösung gegeben. Anschließend folgte eine 4-stündige Inkubation der Platten bei 37°C. Die Reaktion wurde bei 65°C über 3 Min. abgestoppt und im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 50 ul ADH, die mit Puffer 2 im Verhältnis 1:20 vorverdünnt worden war, verblieben die Platten für 10 Min. bei Raumtemperatur, dann für 10 Min.bei 4°C.

Beurteilung:

Die Reaktion wurde bei 340 nm unter der UV-Lampe abgelesen. Die Aktivität wurde vergleichend zum Standard (Streptokokken-NADase 500 E/ml) errechnet.

2.3.3 Bestimmung der Streptokinase-Aktivität

Testprinzip:

Im Test wurde nach einer Modifikation von WILSKE u.SCHIERZ(+) der Methode von BÖSZÖRMENYI(8)vorgegangen.

Streptokinase überführt Plasminogen menschlichen Serums in Plasmin ein aktives proteolytisches Enzym, das Fibrin verdaut. Das Fibrinnetz, das sich bei Anwesenheit von Thrombin aus Fibrinogen aufbaut, wird bei ausreichender Aktivität von Streptokinase in einer Plasminogen-Lösung zerstört.

Reagenzien:

Test-Plasminogen, Fibrinogen, Test-Thrombin und Streptokinase (2000 IE/ml)wurden von den Behring-Werken bezogen. Zusätzlich wurde eine 0,15%ige Coomassie-Blue-Lösung(G-250) verwandt.

Durchführung:

Der Test wurde auf Mikrotiter-Flachbodenplatten* ausgeführt. Alle Reagenzien und die Platten befanden sich im Eisbad. Von der Standard-Streptokinase(2000IE/ml)und den Proben wurden mit Plasminogenlösung(20 CTA-E/ml),die mit gepufferter NaCl-Lösung (pH 7,4)vorverdünnt(1:25)worden war, eine Verdünnungsreihe von 1:8 bis 1:8192 angelegt.

Anschließend wurden zu den 50ul der Plasminogen-Streptokinase- bzw.Plasminogen-Proben-Lösung 50ul Fibrinogen(2mg/ml) und 50ul Thrombin(0,5 NIH/ml)zugegeben, gemischt und für 45 Min. bei 37°C inkubiert.

Nach 10 Min.Aufbewahrung im Eisbad wurde jedem cup ein Tropfen Coomassie-Blue-Lösung zugesetzt, um die Ablesung, d.h.die Differenzierung zwischen Fibrinlysis und clot-Bildung zu erleichtern.

Beurteilung:

Die Streptokinase-Aktivität wurde über den Titer der Standardpräparation errechnet.

– – – – –

* Immunolon von Fa.Flow

\+ Persönliche Mitteilung

2.3.4 Bestimmung der SLO-Aktivität

Testprinzip:

Die SLO-Bestimmung wurde nach dem Prinzip von Todd(48,51)durchgeführt. SLO in reduziertem Zustand bewirkt in einer definierten Hammelblut-Suspension eine Hämolyse. Die Hämolyse wird dann mit Hilfe von Hämolysen-Standards bewertet.

Reagenzien:

1%ige Hammelblut-Erythrozyten-Suspension, Anti-SLO-haltiges Kaninchenserum mit definiertem Antikörpertiter, PBS(phosphatgepufferte Salzlösung mit pH 7,4) und Cysteinchlorid.

Durchführung:

In einer Mikromodifikation der Methode von Smyth u.Arbuthnott(39) wurde ausgehend von 50ul der 1:20 vorverdünnten Probe und 50ul 1%iger Hammelblut-Suspension in Mikrotiterplatten eine Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40 usw.angelegt.
Die Reaktionszeit betrug 45 Min.im Wasserbad bei 37°C. Die Hämolysen-Standards wurden hergestellt, indem ein Präparat einer 1%igen Hammelblut-Suspension mit 100%iger Hämolyse mit nicht hämolysierter 1%iger Hammelblut-Suspension so verdünnt wurde, daß Standards mit 0, 10, 20 usw.bis 100%iger Hämolyse entstanden.

Beurteilung:

Für den positiven SLO-Nachweis wurde eine 50%ige Hämolyse zugrundegelegt. Der reziproke Titer eines cups mit 50%iger Hämolyse entsprach der SLO-Aktivität in hämolysierenden Einheiten.
Die Spezifität des SLO-Nachweises wurde durch einen Hemmversuch mit Anti-SLO-haltigem Kaninchenserum sichergestellt.

2.3.5. Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität

Testprinzip:

Die Bestimmung erfolgte in einer Modifikation nach der Methode von Knoll(Z.Immun.Forsch.142(1972)276). Hyase spaltet Hyaluronsäure, deren Spaltprodukte(ungesättigte Disaccharide)mit CTA (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Farbstoff-Reagenz eine orangefarbene Präzipitation verursachen.

Reagenzien:

Lyophilisiertes Hyaluronsäure-Substrat(Lösung mit 0,07 g/l), lyophilisierte Streptokokken-Hyase(70 E/ml) und CTA-Farbstoffreagenz aus dem Testkit zur Bestimmung der Anti-Hyase-Antikörper der Fa.Behring.

Durchführung:

Von eingeengten Proben wurden je 10ul mit 90ul 0,15M NaCl verdünnt und eine Verdünnungsreihe mit 1:10,20,40 usw.angelegt. Zu je 50ul der nativen,nicht eingeengten Überstände wurden 50ul 0,15M NaCl zugegeben und so eine Verdünnungsreihe 1:2,4,8 usw.hergestellt. Die Standard-Hyase wurde wie die nativen Überstände verdünnt.
Je 50ul der verdünnten Proben wurden mit 50ul des Hyaluronsäure-Substrats gemischt und für 20 Min.bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 50ul CTA-Farbstoff-Reagenz zupipettiert und die Mikrotiterplatten 30 Min.geschüttelt.

Beurteilung:

Nach Ablesen der Präzipitation über einer beleuchteten Milchglasscheibe wurde über den Standard die Hyase-Aktivität berechnet.

2.4. Auftrennung der Exotoxin-Konzentrate mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese(26,56).

2.4.1. Präparation der Konzentrate für die SDS-PE.

Die Exotoxin-Konzentrate wurden mit Lysierungspuffer aus 2% SDS, 5% Mercapto-Äthanol und 3% Saccharose in 25 mM Tris-Puffer(pH 7,0) mit 0,5 ul/ml Bromphenolblau im Verhältnis von 1:1 gemischt. Die so vorbereiteten Proben wurden darauf im Thermoblock für 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Entsprechend wurde mit einer Mischung aus 7 Standard-Proteinen mit Mol.-Gewichten von 14000, 30000, 40000, 68000, 155000 und 165000 Daltons verfahren,die auf jedes Gel als Marker mitaufgetragen wurden.

2.4.2. Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Die Glasplatten, zwischen denen das Gel aufgetragen werden sollte, wurden in 20%iger Chlorbleich-Lösung, in Spülmittel und Wasser gereinigt und anschließend getrocknet.

Je 2 Glasplatten wurden mit Abstandshaltern von 1mm Dicke mit Hilfe von Agar-Lösung verfugt und auf eine Gummiunterlage eingespannt.

Es wurden sowohl 10%ige als auch 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele angefertigt.

Gel-Lösung A bestand aus 12,1 g Tris-Base, die mit A.dest. auf 100 ml aufgefüllt wurde und mit konz.HCl auf pH 8,5 eingestellt wurde. Gel-Lösung B setzte sich aus 28 g Acrylamid, 0,735 g DATD aufgefüllt mit A.dest. auf 100 ml zusammen.

Gel-Lösung A , B und Amper (Anfangskonzentration: 140 mg auf 10 ml H_2O) wurden mit A.dest. so gemischt, daß eine Endkonzentration von 10% bzw. 15% Acrylamid in 0,375 M Tris-Base(pH 8,5) und 0,14 mM Amper, und 2,6% DATD als Quervernetzung gemessen an der Menge der Acrylamid-Monomere resultierte.

Die Mischung wurde entgast, anschließend wurden SDS(Endkonzentration 0,1%) und TEMED(Endkonz.0,035%) zugegeben und ca.25 ml zwischen die verfugten Glasplatten gefüllt. Die Trenngel-Lösung wurde mit A.dest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten.

Nach einer 2-stündigen Polymerisierung des Trenngels wurde das A.dest.entfernt und ein Sammelgel aufgegossen, in das mittels

eines Plastikkammes Taschen geformt wurden.

Das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid in 0,125 M Tris-Puffer(pH 7,0) und 0,3 mM Amper, 0,5% SDS, 0,05% TEMED und 2,6% DATD gemessen an der Menge der Acrylamid-Monomere.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Kämme entfernt und die vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert.

2.4.3. Trennung der Proben.

Das Gel zwischen den Glasplatten wurde oben und unten mit zwei Kammern fest verfugt, in die Elektrophorese -Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 25 ml 20%iges SDS auf 51 ml A.dest.) gegeben wurde. Anschließend wurde bei konst.15 mA über 14 bis 16 Stunden die Elektrophorese vollzogen.

2.4.4. Färbung, Entfärbung und Trocknung der Gele.

Nach Beendigung der Laufzeit wurden die Gele aus den Glasplatten gelöst und in einer Lösung aus 0,5% Coomassie-Blue, 25% Isopropanol, 10% Eisessig für eine Stunde gefärbt.

Anschließend wurden die Gele für 3 bis 4 Stunden in Entfärber-Lösung aus 10% Isopropanol und 10% Eisessig gebracht.

Nach der Entfärbung wurden die Gele kurz in A.dest. gewaschen, auf Whatmann-3MM-Filterpapier gelegt und auf einem Slab-Gel-Dryer der Fa.Bio-Rad unter Vakuum und Erwärmung 2 Stunden lang getrocknet.

2.5. Auftrennung der Exotoxin-Konzentrate mittels Isoelectrofocusing (I.E.F.) (35,53,54).

2.5.1. Herstellung der Gelplatten.

In 15,67 ml A.bidest. wurden 0,132 g Agarose (entspr.0,8%) und 1,65 g Sorbitol(entspr.10%) unter Rühren gelöst und auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung auf ca.60°C wurden 0,83 ml Ampholine (entspr.2%) unter Rühren schnell zugegeben.
Anschließend wurde die Gel-Lösung auf eine exakt horizontal eingestellte Plastikplatte aufgebracht. Nach weiterer Abkühlung und Verfestigung des Gels wurde die Gelplatte in einer feuchten Kammer bei 4°C für 12 Stunden gelagert.

2.5.2. Präparation der Proben.

Je 20 ul der Exotoxin-Konzentrate wurden mit 1 ul Ampholine versetzt. Ebenso wurde für jede Gelplatte ein Extrakt des Stammes H 46 A bzw. eine Protein-Testmischung als Standard vorbereitet.

2.5.3. Auftrennung der Proben.

Die Gelplatte wurde auf eine Kühlplatte mit konst.10°C gelegt und mit zwei Filterpapierstreifen versehen, von denen der eine mit Kathodenlösung (1,3 ml 0,5 M NaOH), der andere mit Anodenlösung (1,0 ml 0,5 M Essigsäure)getränkt worden war. In zwei verschiedenen Positionen (bei 3 und 5 cm der Trennstrecke) wurden Filterpapierplättchen (1,0 x 0,5 cm) auf die Gelplatte aufgebracht, auf die dann je 20 ul der Proben aufgetragen wurden. Mittels eines Power-Supply-Gerätes wurde bei einer konstanten Leistung von 6,25 W pro Gelplatte Spannung an das Gel angelegt.
Nach 25 Minuten waren die Proben ausreichend in das Gel eingedrungen, die Filterpapierplättchen konnten deshalb wieder entfernt werden.
Nach weiteren 35 Minuten wurde die Fokussierung unterbrochen und der pH-Gradient im Gel in 1-cm-Abständen gemessen. Danach wurde nochmals für 10 Minuten Spannung angelegt.
Zu Beginn der Fokussierung betrug die Spannung ca.350 V und die Stromstärke 0,018 A, am Ende ca. 700 V und 0,009 A .

2.5.4. Fixierung und Färbung des Gels.

Nach der Fokussierung wurde die Gelplatte für 5 Minuten in Fixierlösung (Sulfosalizylsäure 3,46%, Trichloressigsäure 11,5%) gebracht.

Anschließend wurde die Gelplatte zweimal je 10 Min. in 95% Äthanol gewaschen. Danach wurde das Gel zwischen Filterpapier mit 1 kp für 20 Min.gepreßt.
Das Gel wurde getrocknet und 10 Min. in einer Lösung aus 5 g Coomassie-Blue in 250 ml Entfärbelösung (s.u.) gefärbt.
Darauf wurde das Gel zweimal je 5 Min. in einer Lösung aus 35% Äthanol und 10% Essigsäure entfärbt und anschließend getrocknet.

Materialien:

zu 2.5.1.: Agarose-EF von Fa.LKB, Sorbitol von Fa.Sigma, Ampholine (pH-Gradient 3,5-9,5), Plastikplatten und Filterpapier von Fa.LKB.

zu 2.5.2.: Extrakt der extrazellulären Produkte des Stammes H 46 A von Fa.Behring, Proteintestmischung von Fa. Serva.

zu 2.5.3.: Multiphor Kühl-und Elektrodenplatte, Gleichstrom-Power-Supply und Multiphor pH-Elektrode von Fa.LKB.

2.6. Proteinbestimmung im Exotoxin-Konzentrat.

Zur Messung der Proteinkonzentrationen wurden zwei Verfahren angewandt. Auf Grund des geringen zur Verfügung stehenden Probenvolumens und der relativ kleinen Gesamtproteinmenge konnte die Bestimmung nur mit Mikro-Methoden vorgenommen werden.

2.6.1. Proteinbestimmung mit der Folin-Reaktion in der Modifikation nach LOWRY (29).

Testprinzip: a. Kupfer reagiert in alkalischer Lösung mit Farbumschlag. b. Folin-Reagens wird durch Kupfer-behandeltes Protein reduziert und ändert dabei seine Farbe.

Durchführung: Reagens A(2% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH) und Reagens B (0,5% $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ in 1% Na-Tartrat)wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Zu 0,2 ml Probenlösung wurden 1,0 ml obiger Mischung aus Reagens A und B gegeben. 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagens, das auf 1 N Säuregehalt eingestellt worden war, wurden schnell zupipettiert und gemischt.

Nach 30 Min. wurde die Extinktion bei 500 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe von Standards und einer Eichkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.6.2. Proteinbestimmung mit dem Test-Set der Fa.Bio-Rad in der Modifikation nach BRADFORD (9,41).

Testprinzip: Coomassie-Brillant-Blue G-250 (Fa.Serva) existiert in den Farben rot und blau. Wird der Farbstoff an Protein gebunden, erfolgt ein Farbumschlag von rot nach blau.

Durchführung: Zur Anwendung kam die Standardmethode, bei der 0,1 ml der Standards bzw. der Proben mit 5 ml Farbreagens vermischt wurden.

Die Extinktion wurde bei 595 nm im Photometer gemessen, die Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichkurve errechnet.

3. Ergebnisse.

3.1. Zu 2.2.: Präparation der Exotoxin-Konzentrate.

Schwierigkeiten bei der Präparation der Konzentrate ergaben sich v.a.bei der Sterilfiltration. 6 Stämme(A 40158, B 36208,G 35880, 36717, 3910, 4651) produzierten reichlich Schleimsubstanzen,die zur sofortigen Undurchlässigkeit der Sterilfilter führten. Deshalb mußten diese Stämme zusätzlich bei 10000 U/min.für 15 Min. nachzentrifugiert werden und gegebenenfalls mit einem gröberen Filter (Porengröße 0,45 um) vorfiltriert werden.
Durchschnittlich dauerte die Einengung der Sterilfiltrate zwischen 10 und 14 Stunden und damit erheblich länger, als man üblicherweise bei Verwendung der Geräte erwarten müßte. Hierfür sind möglicherweise Nährbodensubstanzen, die durch die Dialyse nicht vollständig eliminiert werden konnten, verantwortlich zu machen.

3.2. Enzymatische Aktivitäten von DNAse, NADase,Streptokinase, Streptolysin O und Hyaluronidase.

Die enzymatischen Aktivitäten der untersuchten Stämme sind in Tab.1.1 zusammengestellt. Die Verteilung der Enzymaktivitäten nach Gruppen ist aus den Tabellen 1.2 und 1.3 zu entnehmen.
Bei den Stämmen der Gruppe A fiel die sehr hohe DNAse-Aktivität im Vergleich zur mäßigen NADase-,Sk-und SLO-Aktivität und der geringen Hyase-Aktivität auf.
Bei den B-Stämmen fand man eine allgemein niedrige enzymatische Aktivität, die häufig nur im Konzentrat nachweisbar war. Lediglich DNAse wurde von nahezu allen Stämmen in mäßiger Menge produziert. Vereinzelte hohe Aktivitäten kamen bei zwei Stämmen (B 484,B 23943) vor. NADase konnte nur bei zwei, SLO nur bei einem einzigen Stamm (B 23943) nachgewiesen werden.
Alle Stämme der Gruppe C zeigten gute DNAse-Aktivität, die meisten auch sehr gute Hyase-Aktivität. NADase, Sk und SLO wurden in mäßiger Menge nur von den 3 Stämmen des Str.equisimilis (C 25903,

27345, 27340) produziert.
Die Gruppe G wies von allen Gruppen die stärksten Enzymaktivitäten auf. DNAse war zwar nur in mäßigen Mengen zu finden, insgesamt zeichneten sich alle G-Stämme durch hohe bis sehr hohe Aktivitäten bei NADase, Sk, SLO und Hyase aus.
Bei 10 Stämmen (A 40158, B 36208,38625,G 36717, 3090,31155, 35880,37597, 4651,24983) und allen 3 Stämmen mit nicht definierter Gruppe (24702, 7326, 3910) konnte keine oder nur minimale Enzymaktivität nachgewiesen werden. 6 der Stämme waren bereits bei der Präparation durch ihre Schleimsubstanzen und erschwerte Sterilfiltration aufgefallen. Da diese 13 Stämme auch Besonderheiten bezüglich ihres Verhaltens in der SDS-PE und im I.E.F. besaßen, die später erörtert werden sollen, wurden diese Stämme mit x gekennnzeichnet.
Von allen Stämmen wurden sowohl die ca.600fach eingeengten Konzentrate als auch die lediglich sterilfiltrierten Überstände auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Der Vergleich von Konzentraten und lediglich sterilfiltrierten, nativen Überständen ergab, daß außer bei SLO, das als sehr empfindliches Enzym bekannt ist, durch den Einengungsprozeß kein nennenswerter Verlust der enzymatischen Aktivität eintrat. Ein exakter und konstanter Quotient der Aktivitäten von Konzentraten zu nativen Überständen ließ sich nicht ermitteln, weil die Einengung durch die Methode bedingt nur annähernd 600fach durchgeführt werden konnte. Ferner wurde die Nachweisgrenze von den nativen Überständen häufig unterschritten.
Die Bestimmung der Hyase wurde dadurch erschwert, daß wahrscheinlich nährbodenbedingte Hemmphänomene auftraten. So war der Nachweis bei niedrigen Verdünnungen häufig negativ und wurde erst bei höheren Verdünnungen positiv. Deshalb wurde hier auf die Angabe genauer Titer und entsprechender enzymatischer Einheiten verzichtet und lediglich in starke, nachweisbare und nicht-nachweisbare Hyase-Aktivität unterteilt.

Enzym / Stamm	DNAse(E/ml) konz.	DNAse(E/ml) nativ	NADase(E/ml) konz.	NADase(E/ml) nativ	Sk(E/ml) konz.	Sk(E/ml) nativ	SLO(E/ml) konz.	SLO(E/ml) nativ	Hyase konz.	Hyase nativ
A 22815	307200	1920	-	-	-	-	20	4	-	-
A 38287	19200	960	8000	800	125	5	40	16	+	-
A 23503	307200	480	1000	50	125	5	-	-	-	-
A 23618	614400	1920	8000	100	2000	-	20	-	-	-
A 23731	307200	960	8000	200	-	-	-	-	-	-
A 20090	614400	1920	250	25	250	-	-	-	-	-
A 37636	614400	960	8000	50	125	20	40	-	++	-
A 23980	307200	960	-	-	31,25	-	20	4	-	-
A 22526	307200	480	-	-	31,25	-	160	-	-	-
A 40158 x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 8171	4800	60	-	-	-	-	-	-	-	-
B 11949	9600	15	-	-	-	-	-	-	-	-
B 484	153600	60	1000	-	4000	-	-	-	-	-
B 3868	4800	-	-	-	1,95	-	-	-	-	-
B 22722	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
B 3274	9600	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 23003	2400	-	-	-	-	-	-	-	++	-
B 7492	2400	30	-	-	-	-	-	-	-	-
B 3117	4800	-	-	-	-	-	-	-	-	-
untere Nachweisgrenze	150	15	125	12,5	1,95	0,3	20	2	87,5	70

Enzym / Stamm	DNAse(E/ml) konz.	DNAse(E/ml) nativ	NADase(E/ml) konz.	NADase(E/ml) nativ	Sk(E/ml) konz.	Sk(E/ml) nativ	SLO(E/ml) konz.	SLO(E/ml) nativ	Hyase konz.	Hyase nativ
B 23943	9600	-	8000	-	16000	-	160	-	++	-
B 23466	-	-	-	-	1,95	-	-	-	-	-
B 8601	9600	15	-	-	-	-	-	-	-	-
B 11051	9600	30	-	-	-	-	-	-	-	-
B 36208 x	-	-	-	-	15,6	-	-	-	-	-
B 38625 x	-	-	-	-	62,5	-	-	-	+	-
C 25903	19200	240	8000	200	500	6,25	160	8	++	+
C 26466	1200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 29216	4800	30	500	-	62,5	-	-	-	+	
C 27345	38400	240	4000	800	1000	6,25	40	8	++	+
C 13000	1200	-	-	-	3,9	-	-	-	-	-
C 2200	4800	960	-	-	-	-	-	-	++	-
C 12168	76800	960	-	-	-	-	-	-	++	-
C 27340	300	-	8000	100	4000	25	40	2	++	+
G 14911	600	-	500	50	250	10	40	32	++	+
G 15092	300	-	1000	-	4000	-	80	-	++	+
G 17586	19200	60	16000	200	1000	2,5	160	8	++	-
G 14420	1200	-	4000	-	4000	-	160	-	++	-
untere Nachweisgrenze	150	15	125	12,5	1,95	0,3	20	2	87,5	70

Tabelle 1.1 : Enzymatische Aktivitäten der konzentrierten und nativen Überstände von 54 Stämmen(Gr.A,B,C und G).
- : Enzymat.Aktivität unter der Nachweisgrenze
x : siehe 4.2

Angabe der Hyase-Aktivität (s.3.2)
konz.: + :≥ 5600 nativ: + :≥70
++:≥11200

Enzym / Stamm	DNAse(E/ml)		NADase(E/ml)		Sk(E/ml)		SLO(E/ml)		Hyase	
	konz.	nativ	konz.	nativ	konz.	nativ	konz.	nativ	konz.	nativ
G 15042	150	-	1000	200	2000	80	320	4	++	-
G 16906	600	-	1000	50	8000	20	320	4	++	-
G 32863	1200	-	16000	-	4000	125	320	-	++	-
G 23122	600	-	500	-	15,6	-	160	-	++	-
G 25237	1200	-	500	200	2000	80	160	4	++	-
G 5712	38400	-	2000	50	4000	80	80	4	++	-
G 22180	600	-	8000	25	500	5,2	1280	2	++	-
G 36717 x	-	-	250	-	7,8	-	-	-	++	-
G 3090 x	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 31155 x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 35880 x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 37597 x	-	-	-	-	15,6	-	-	-	-	-
G 4651 x	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 24983 x	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
24702 x	-	-	-	-	3,9	-	-	-	-	-
7326 x	-	-	-	-	7,8	-	-	-	-	-
3910 x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
untere Nachweisgrenze	150	15	125	12,5	1,9	0,3	20	2	87,5	70

Tabelle 1.1 : Enzymatische Aktivitäten der konzentrierten und nativen Überstände von 54 Stämmen(Gr.A,B,C und G).
- : Enzymat.Aktivität unter der Nachweisgrenze
x : siehe 3.2

Angabe der Hyase-Aktivität (s.3.2)
konz.: + :≤ 5600 nativ: + :≥70
++:≥11200

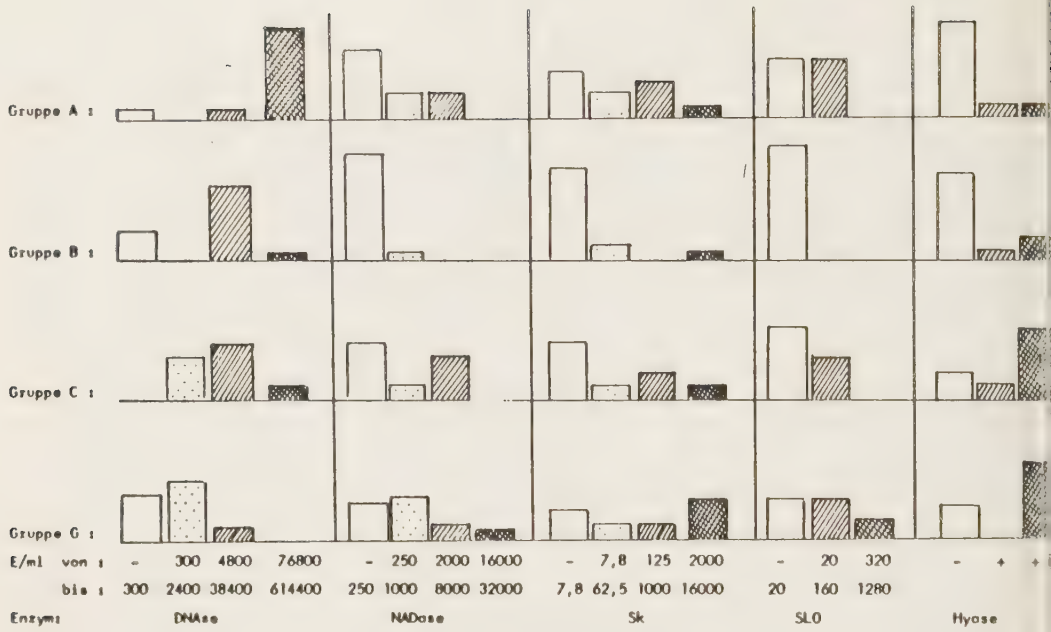


Tabelle 1.2 : Verteilung der enzymatischen Aktivität nach Gruppen

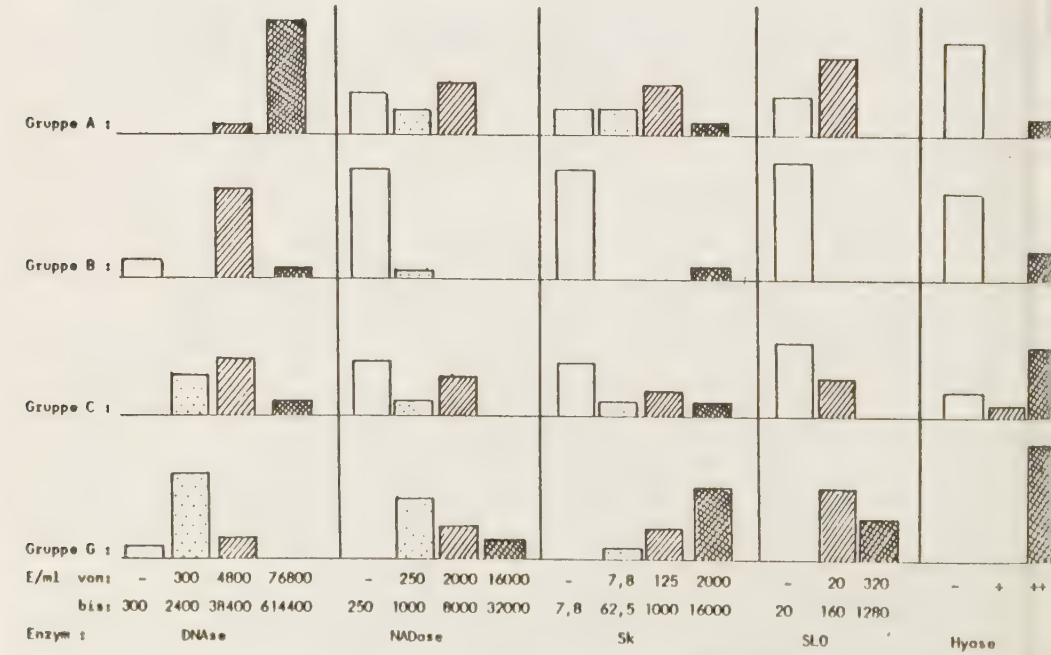


Tabelle 1.3 : Verteilung der enzymatischen Aktivität nach Gruppen ohne x-Stämme

3.3. Auftrennung und Darstellung der Exotoxin-Konzentrate in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Alle Konzentrate wurden zwecks einer exakteren Auswertung sowohl in einem 10%igen als auch in einem 15%igen Gel getrennt, wobei die Bandenspreizung beim 10%igen Gel zwischen 35000 und 70000 D,beim 15%igen Gel zwischen 15000 D und 50000 D am breitesten ist. Die Bandenmuster der einzelnen Stämme sind in Tab.2 zusammengestellt. Die den Banden zugeordneten Zahlen ergeben mit 10^3 multipliziert das Molekulargewicht der Banden.

Die 39 unterscheidbaren Banden erstreckten sich über ein breites Spektrum mit Molekulargewichten von 17000 bis 150000 D,die Häufigkeit der Banden war recht unterschiedlich.So war z.B.Bande 53 in 40 Fällen, Bande 120 nur in einem Fall nachweisbar.

Die Bandenzahl war bei Gruppe C mit durchschnittlich 16(6 bis 21) Banden pro Stamm am höchsten, fiel dann bei Gruppe G mit 13,4(6-21), bei Gruppe A mit 9,1(4-13) bis auf 6,7(3-14) Banden pro Stamm bei Gruppe B ab.

Besonders zu erwähnen sind 11 Stämme(1 A-,1 B-,6 G-Stämme und 3 Stämme mit nicht definierter Gruppe),die sich durch ihr charakteristisches Bandenmuster von den anderen Stämmen deutlich abhoben. Sie sind in Tab.2 und in Abb.2 mit x gekennzeichnet. Ihr Bandenmuster war folgendes: 24-25,5-28-32-45-49-65-68-88 . Besonders stark ausgeprägt war bei diesen Stämmen die Doppelbande 45-49 . Gemeinsame Banden mit anderen Stämmen, die diese charakteristische Doppelbande nicht besaßen, traten nur sporadisch wie bei Bande 53 auf. Wie in 3.2.beschrieben zeichneten sich diese Stämme durch minimale Enzymaktvität aus. 3 dieser Stämme (G 3090,36717,37597) warteten im Vergleich zu den anderen x-Stämmen mit einer etwas besseren Aktivität auf(s.Tab.1.1.) Bei diesen drei Stämmen war das oben beschriebene Muster ebenfalls vorhanden,Bande 49 der Doppelbande 45-49 war jedoch deutlich schwächer ausgebildet.

Relativ ähnliche Muster besaßen die Stämme der Gruppen A, C und G sowohl innerhalb der Gruppe als auch im Vergleich der Gruppen

untereinander. Folgendes charakteristisches Muster war mit geringen Abweichungen bei solchen Stämmen der Gruppen A,C und G zu finden, die auch eine gute enzymatische Aktivität aufwiesen: 26-27-31-37-40-44-53-60-72 . Einige Stämme der Gruppe A boten zusätzlich zu diesem Muster die Bande 42, bei Gruppe G waren in 9 bzw. 12 Fällen Banden im Bereich 17-18,5-20 bzw. 65-66-67 zusätzlich zu ermitteln (s.a. Abb. 1 und 2).
Die C-Stämme erwiesen sich als die Gruppe, die eine besonders hohe Bandenfrequenz besaß. Über das oben beschriebene gemeinsame Muster hinaus fand man die Banden 33 und 55 bei 5 bzw.3 Stämmen.
Die Stämme der Gruppe B hatten allgemein nur wenige Banden. Gemeinsam mit den Gruppen A,C und G traten nur die Banden 31 und 40 in Erscheinung, die bei 10 von 15 Stämmen anzutreffen waren. 5 Stämme zeigten Banden zwischen 130 und 150, also im ausgesprochen hochmolekularen Bereich. Auch innerhalb der Gruppe waren Gemeinsamkeiten nur schwer zu ermitteln. Ähnliche Muster ergaben sich immer nur zwischen zwei Stämmen wie z.B. zwischen B 3868 und B 11949 oder B 3117 und B 3274 . Ein Stamm(B 23943), bei dem auch gute enzymatische Aktivitäten nachgewiesen wurden, stimmte in Bande 31-37-40-44-53 mit dem Muster der Stämme A,C und G überein.

3.4. Auftrennung und Darstellung der Exotoxin-Konzentrate im I.E.F.

Die Exotoxinkonzentrate aller Stämme wurden dem I.E.F. unterzogen. Es wurde sowohl eine direkte Messung der pI-Werte der einzelnen Banden mit Hilfe einer pH-Elektrode auf dem Gel durchgeführt, als auch mittels einer Testmischung aus 8 Proteinen mit definierten pI-Werten und einem Kulturfiltrat des Laborstammes H 46 A der Behring-Werke, die auf jedes Gel mitaufgetragen worden waren, die pI-Werte der Banden indirekt ermittelt.
Die Banden und die entsprechenden pI-Werte der einzelnen Stämme sind aus Tab.3 zu ersehen.
Insgesamt wurden 23 unterscheidbare Banden in einem pH-Bereich von 3,6 bis 8,7 gefunden. Die Banden wurden alphabetisch mit

A bis S gekennzeichnet. Die Banden G,N,O und P mußten weiter unterteilt werden, da jeweils zwei bzw. drei Banden deutlich unterscheidbar waren, obwohl ihnen meßtechnisch bedingt nur ein pI-Wert zugeordnet werden konnte.

Durchschnittlich wurden bei Gruppe A 11,6 (7 bis 17), bei Gruppe B 9,7 (3 bis 16), bei Gruppe C 10,0 (8 bis 13) und bei Gruppe G 8,3 (4 bis 15) Banden je Stamm ermittelt.

Allgemein konnte man feststellen, daß die Mehrzahl der Banden (95%) im pI-Bereich von 5,7(E) bis 3,6(S) lag,und daß Banden im alkalischen Bereich ausgesprochen selten anzutreffen waren. Am häufigsten fand man die Banden N_1,P_1und P_2, die nur bei ca. 10% der Stämme fehlten. Vermißt wurden jedoch so offensichtlich einheitliche Muster, wie sie bei der SDS-PE vorlagen.

Das breiteste Bandenspektrum bezüglich des pI-Wertes besaßen die Stämme der Gruppe A. 8 Stämme wiesen die Bande D(pI 6,7), 6 Stämme die Bande C(pI 8,3), 5 Stämme Bande B(pI 8,5) und 2 Stämme die Bande A(pI 8,7)auf(s.Abb.3). Diese hohe Bandenfrequenz im alkalischen Bereich zusammen mit den stark ausgeprägten Banden P_1,P_2,Q und v.a. R waren charakteristisch für die Gruppe A.

Für die B-Stämme ließ sich nur schwer ein spezifisches Muster eruieren, da sie sich wie auch in der SDS-PE recht unterschiedlich verhielten. Etliche Stämme (B 11949,3868,23943,4374) besaßen die Banden E bis R nahezu vollständig, andere beschränkten sich auf wenige jedoch kräftig ausgebildete Banden wie G_2,M,N_2 und seltener R.

Die homogenste Gruppe bildeten die C-Stämme, bei denen folgendes Muster auffällig war: E-K-L-M-N_1-O_1-O_2-P_1-P_2. Ein Stamm(C 29216) imponierte mit einer starken I-Bande, zwei Stämme (C 26466,27345) zeigten die seltene S-Bande.

Die Mehrzahl der Banden der Gruppe G lag zwischen H und P_3. Alle G-Stämme wiesen die Banden N_1,P_1und P_2 auf. Besonders auffällig waren die Bande I in 5 Fällen (G 15092,14420,32863,25237, 5712) und die Bande L in 4 Fällen (G 17586,32863,15042,5712).

Wieder hoben sich die x-Stämme von der anderen Stämmen mit folgendem charakteristischem Muster ab: $M-N_1-N_2-O_2-P_3$ (s.Abb.4). Zwar waren diese Banden auch bei anderen Stämmen anzutreffen, in dieser starken Ausprägung waren sie für die x-Stämme jedoch spezifisch. Banden mit einem pI über 4,8(M)existierten bei diesen Stämmen nicht. Die Bandenzahl der x-Stämme war im I.E.F. mit 7 bis 8 gegenüber 16 bis 17 in der SDS-PE geringer.

3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration im Exotoxinkonzentrat.

Bei der Anwendung beider Methoden ergab sich, daß die Eigenfarbe der Konzentrate, die auf die gelbe Nährbodenfarbe der THB zurückzuführen ist, die Messung erheblich beeinträchtigte. In beiden Tests wurden zur Kontrolle Konzentrate eines unbeimpften Nährbodens mitgeführt, die durch die vorausgegangene Dialyse frei von Polypeptiden und Proteinen war. Daß tatsächlich in diesen unbeimpften Nährbodenkonzentraten kein Eiweiß zu finden war, wurde sowohl in der SDS-PE als auch im I.E.F. deutlich. In keiner der Elektrophoresen konnten Banden im unbeimpften Nährbodenkonzentrat sichtbar gemacht werden.
Jedoch waren in allen Nährbodenkonzentraten Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml mit der Bio-Rad- Methode, bis 4 mg/ml mit der Folin-Reaktion gemessen und errechnet worden. Da diese Konzentrationen z.T. über den Werten der Exotoxinkonzentrate aus beimpften Nährböden lagen, waren die Meßergebnisse beider Proteinbestimmungen kaum zu verwerten. Miteinbezogen in die Überlegungen müssen auch die zahlreichen chemischen Verbindungen, die den Ablauf der Protein-Nachweisreaktionen beeinflussen. Da die THB hauptsächlich aus behandeltem Rindfleischextrakt und damit aus einem chemisch nicht genau definierbaren Stoffgemisch besteht, lassen sich hier Störfaktoren nicht ausschließen.

Mol.Gew. ($n \times 10^3$)	17	18,5	20	24	25,5	26	27	28	31	32	33	36	37	37,5	38	40	41	42	44	45	49	53	55	60	65	66	67	68	72	80	84	88	90	96	100	120	130	140	150
Stämme:																																							
A 22815	.	.	.	.	.	+	+	∘	+	.	.	.	+	.	.	+	.	+	+	.	.	+	.	+	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.
A 23503	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	+	+	.	.	+	.	+	∘	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.
A 23618	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	+	+	.	.	+	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 23731	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 20090	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 37636	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	+	.	.	+	.	+	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 23980	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	∘	.	.	.	.	.	.	.	.
A 22526	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 40158x	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	+	+	.	.	+	.	+	+	+	.	.	+	.	+	+	+	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.
B 8171	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	+	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 11949	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	+	.	+	.	+
B 3868	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.
B 22722	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	∘	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
B 3274	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	+	+	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.
B 23003	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	+	.	+	.	+	.	.	.	.	.
B 7492	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 3117	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+
B 23466	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 23943	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	∘	+	.	.	+	.	∘	+	+	+	∘	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.
B 8601	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 38625	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 35566	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	∘	.	.	.	.	.	.	∘	.	+	.	.	.	.	.	.
B 36208x	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	+	+	.	+	+	.	+	+	.	+	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.
7326x	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	+	+	+	.	.	+	.	.	+	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.
3910x	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	.	+	+	+	.	.	+	.	∘	+	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.
24702x	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	+	+	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	.

Tab.2 : Auswertung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

+ : Bande vorhanden . : Bande nicht nachweisbar

++: Bande stark ausgeprägt

Mol.Gew. ($n \times 10^3$)	17	18,5	20	24	25,5	26	27	28	31	32	33	36	37	37,5	38	40	41	42	44	45	49	53	55	60	65	66	67	68	72	80	84	88	90	96	100	120	130	140	150
Stämme:																																							
C 25903	.	.	o	o	o	+	+	+	+	.	+	.	+	+	.	‡	.	+	‡	.	.	‡	.	+	‡	.	+	.	‡	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.
C 26466	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	.	+	+	+	.	+	.	+	+	+	+	.	+	.	.	.	.	.
C 29216	.	.	.	.	o	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	.	‡	.	+	+	+	.	.	+	+	.	+	.	+	+	+	.	.	.
C 27345	.	.	o	o	o	.	.	o	+	.	+	.	+	+	.	+	.	.	‡	.	.	‡	.	+	‡	.	+	.	‡	+	+	+	.	+	+	.	.	.	.
C 13000	.	o	o	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	+	+	+	+	.	+	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.
C 2200	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.
C 12168	.	.	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	‡	.	.	‡	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C 27340	.	.	.	.	.	+	.	+	+	.	+	.	+	.	.	‡	.	+	‡	.	.	+	+	‡	+	+	+	.	‡	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.
G 14911	+	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	.	+	.	+	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G 15092	+	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	+	.	.	.	.	+	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.
G 17586	+	+	+	.	.	+	+	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	.	+	.	+	.	.	.	+	+	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.
G 14420	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	o	+	.	+	+	+	+	.	.	o	+	.	.	+	.	.	.	.	.
G 32863	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G 16906	+	+	+	.	.	‡	.	.	‡	.	.	.	+	.	.	‡	.	.	+	.	.	+	.	+	+	+	+	+	+	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.
G 23122	.	.	.	.	.	+	+	.	‡	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G 36717	.	+	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	.	.	‡	+	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 15042	.	.	+	.	.	+	+	.	+	.	.	.	‡	.	.	‡	.	.	‡	.	.	‡	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	.	+	.	.	.	.
G 25237	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	‡	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
G 5712	.	+	+	.	.	+	+	.	‡	.	.	.	+	.	.	‡	.	.	‡	.	.	+	.	+	+	+	.	+	‡	.	+	+	.	+	.	.	.	.	.
G 22180	+	+	+	.	.	+	+	.	‡	.	‡	.	+	.	.	‡	.	.	‡	.	.	‡	.	+	+	+	.	+	‡	.	+	+	.	+	+	+	.	.	.
G 4651x	.	.	.	‡	‡	.	.	‡	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	‡	‡	+	.	.	‡	.	+	+	.	+	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 37597x	.	.	o	+	+	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	‡	‡	+	.	.	+	.	+	+	.	+	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 31155x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	+	+	.	+	+	.	‡	‡	+	.	.	‡	o	.	‡	+	.	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 35880x	.	.	.	.	‡	.	.	+	.	+	+	+	.	+	+	.	+	+	.	‡	‡	+	.	.	‡	.	+	‡	.	.	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 3090x	.	+	+	+	+	.	.	+	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	‡	+	+	.	.	‡	.	+	‡	.	+	.	‡	.	.	.	.	.	.	.
G 24983x	.	.	.	+	+	.	.	+	.	+	.	+	.	+	+	.	+	+	.	‡	‡	+	.	.	+	.	+	‡	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.

Tab.2 : Auswertung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

+ : Bande vorhanden . : Bande nicht nachweisbar

++: Bande stark ausgeprägt

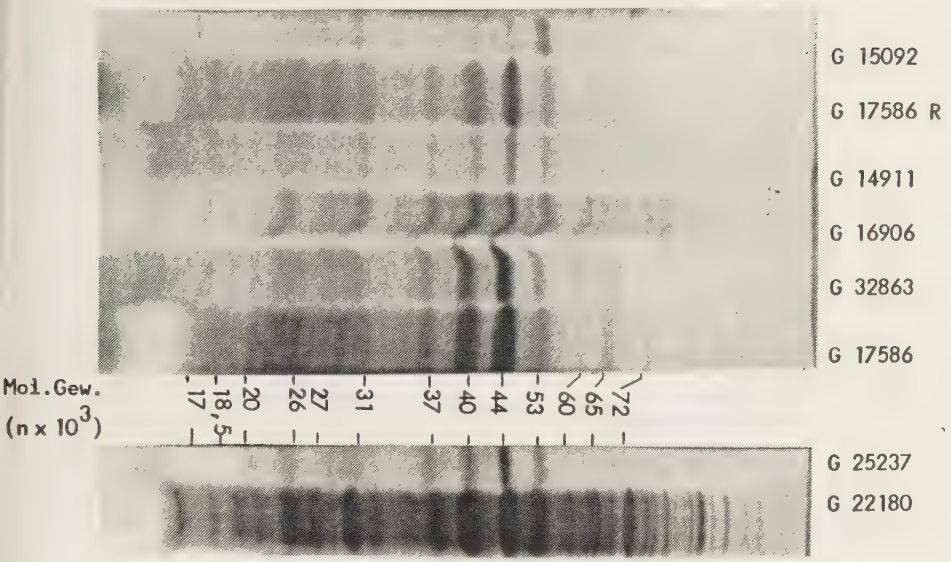
pH:	8,7/8,5/8,3/6,7/5,7/5,6/5,5/5,3/5,2/5,1/4,9/4,8/4,6/4,4/4,0																					/3,9/3,8/3,6
Banden:	A	B	C	D	E	F	G_1	G_2	H	I	K	L	M	N_1	N_2	O_1	O_2	P_1	P_2	P_3	Q	R	S
Stämme																							
A 22815	.	.	.	‡	+	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	‡	‡	.	.	‡	.
A 38287	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	+	+	+	+	.	.	‡	.
A 23503	+	+	‡	+	.	.	.	.	.	+	.	+	+	‡	+	+	+	‡	‡	.	‡	‡	.
A 23618	+	+	+	+	+	.	.	.	.	+	.	+	+	‡	+	+	+	‡	‡	.	‡	‡	.
A 23731	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	‡	‡	.	.	+	+
A 20090	.	.	+	+	.	.	+	+	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	.
A 37636	.	+	+	+	.	.	+	‡	.	+	+	.	.	.	.	+	+	+	+	.	.	+	.
A 23980	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	+	.
A 22526	.	+	+	‡	+	.	+	.	+	+	.	+	‡	+	+	+	+	‡	‡	.	.	+	+
A 40158x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	‡	+	+	‡	.	.	.
B 8171	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	‡	+	‡	+	+	+	+	.	.	+	.
B 11949	.	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	+	‡	‡	‡	‡	+	+	+	.	.	+	.
B 484	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	.
B 3868	.	+	.	.	+	+		+	+	.	.	.	‡	+	+	‡	+	+	+	.	.	+	.
B 22722	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	.
B 3274	.	.	.	.	+	.	+	+	+	+	+	+	‡	+	‡	+	+	+	+	.	.	+	.
B 23003	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	‡	+	+	+	.	.	.	+	.
B 7492	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	.
B 3117	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	‡	‡	‡	+	.	+	.	.	.	+	.
B 23466	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	‡	+	+	+	+	+	.	.	.	.
B 23943	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	.
B 8601	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	.	+	.	+	.	+	+	+	.	.	+	.
B 11051	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	‡	.	.	.	.	.	.	.	.
B 35566	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	‡	+	+	+	+	+	.	.	.	.
B 36208x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	‡	+	+	‡	+	+	‡	.	.	.
C 25903	.	.	.	.	+	.	+	.	.	+	.	+	.	‡	.	+	+	+	+	+	.	+	.
C 26466	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	+	‡	.	.	.	+	+	+	.	+	+
C 29216	.	.	.	.	+	.	+	.	.	‡	.	+	+	‡	.	.	+	+	+	.	.	+	.
C 27345	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	+	+	+	‡	.	+	+	+	+	+	.	.	+
C 13000	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	+	+	‡	.	+	+	+	+	+	.	.	.
C 2200	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	‡	+	+	.	+	.	+	.	.	.

Tab.3 : Auswertung des Isoelectrofocusing

pH:	8,7/8,5/8,3/6,7/5,7/5,6/5,5/5,3/5,2/5,1/4,9/4,8/4,6/4,4/4,0 /3,9/3,8/3,6																							
Banden:	A	B	C	D	E	F	G_1	G_2	H	I	K	L	M	N_1	N_2	O_1	O_2	P_1	P_2	P_3	Q	R	S
Stämme																							
C 12168	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	+	+	+	++	.	+	+	+	.	.	.	.	.
C 27340	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	++	.	+	+	+	+	.	.	.	.
G 14911	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	++	+	+	+	+	+	.	.	.	.
G 15092	.	.	.	.	.	.	.	.	+	++	.	.	.	++	+	+	+	+	+	.	.	.	.
G 17586	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	++	.	++	+	.	.	+	+	.	.	.	.
G 14420	.	.	.	.	.	.	.	.	.	++	.	+	+	++	+	+	+	+	+	+	.	.	.
G 32863	.	.	.	.	+	.	.	.	+	++	+	++	+	++	+	.	.	+	+	+	.	.	.
G 16906	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	.	+	.
G 23122	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	+	+	.	.	.	.
G 36717	.	.	.	.	.	.	.	.	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	.	.	.
G 15042	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	++	.	++	+	.	+	+	+	.	.	.	.
G 25237	.	.	.	.	.	.	.	.	+	++	+	+	+	++	+	+++	+	+	+	+	.	.	.
G 5712	.	.	.	+	+	+	.	.	+	++	+	++	+	++	+	+	+	++	+	+	.	.	.
G 22180	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	++	.	.	.	+	+	+	.	.	.
G 4651x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	++	+	+	++	.	.	.
G 37597x	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	+	+	+	.	++	+	+	++	.	.	.
G 31155x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	+	+	+	++	.	.	.
G 35880x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	++	+	+	++	.	.	.
G 3090x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	++	++	+	+	++	.	.	.
G 24983x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	++	++	++	.	.	+	.
7326x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	++	+	+	++	.	.	.
3910x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	++	+	++	+	+	++	.	.	.
24702x	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	++	++	+	++	+	+	++	.	.	.

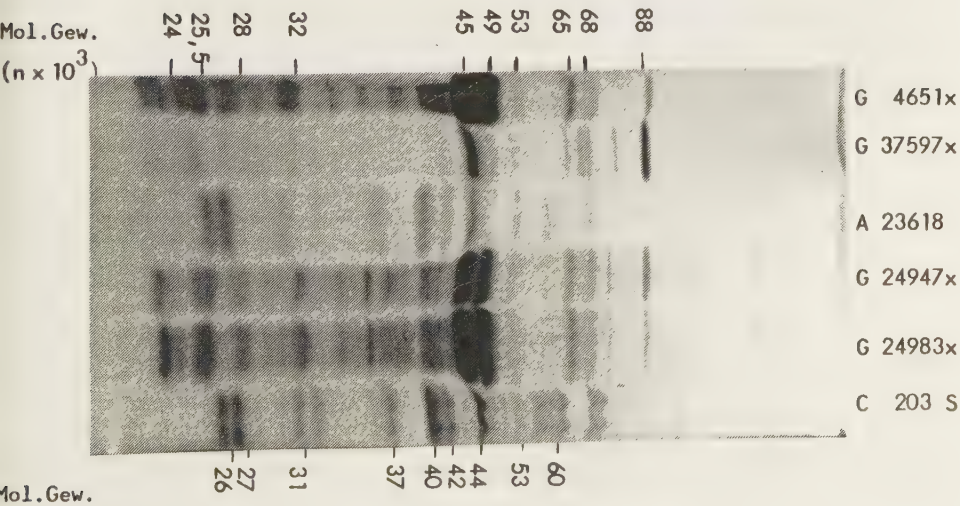
Tab.3 : Auswertung des Isoelectrofocusing

+ : Bande nachweisbar
++: Bande stark ausgeprägt
. : Bande nicht nachweisbar



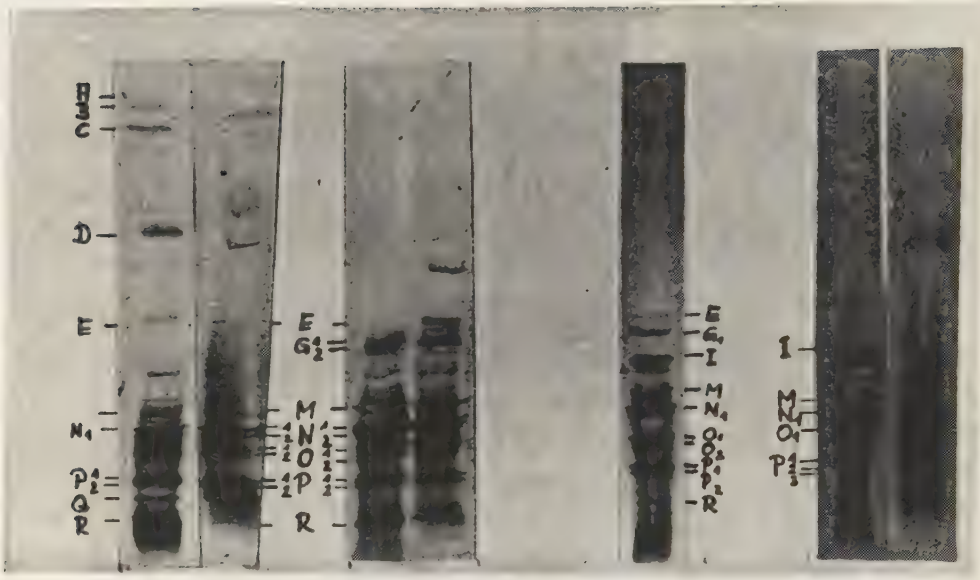
Stämme

Abb.1 : Typisches Muster einiger G-Stämme in der SDS-PE.



Stämme

Abb.2 : Vergleich von x-Stämmen mit enzymstarken Stämmen(A 23618,Laborstamm C203S).



A 23618 B 11949 C 29216 G 25237

Abb.3 : I.E.F.-Muster enzymstarker Stämme der Gruppen A,B,C und G.

A 40158 B 36208 G 31155 24702

Abb.4 : I.E.F.-Muster der auffällig enzymschwachen x-Stämme.

4. Diskussion

Allgemein wird davon ausgegangen, daß Enzyme bzw. Exotoxine entscheidende Faktoren für die Pathogenität bzw. Virulenz von Streptokokken darstellen, obgleich die Wirkungsmechanismen der einzelnen Enzyme und deren Zusammenwirken noch weitgehend unklar sind.
Die serologische Typisierung nach Lancefield gibt zwar Hinweise auf die Pathogenität, für die Virulenz jedoch werden als wesentliche Merkmale Exotoxine angenommen, wobei nicht nur die einzelnen Enzyme für sich, sondern auch Kombinationen von Enzymen von Bedeutung sein können.Dies wird z.B. für den pathogenetischen Wirkungsmechanismus der Hyaluronidase diskutiert, die als sog."spreading factor" Hyaluronsäure-Bestandteile auf Schleimhäuten des Oropharynx zerstört (16) und damit das Eindringen und die Ausbreitung von Streptokokken im Gewebe und deren Abgabe von Toxinen begünstigen könnte, wobei dieser Mechanismus für in-vivo-Bedingungen noch keineswegs bewiesen ist.
So liegt der Gedanke nahe, Streptokokkenstämme nicht nur hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu serologischen Gruppen, sondern darüberhinaus nach ihrem Toxinbildungsvermögen zu charakterisieren.
Dieses Vorhaben stößt auf eine Reihe von Schwierigkeiten, die mit der Gewinnung eines relevanten Untersuchungsgutes beginnen. Es darf als sicher gelten, daß die Toxinproduktion milieuabhängig ist(59), also Unterschiede im Wirts- bzw. Kulturmedium aufweist, die sich bei wiederholten Kulturpassagen möglicherweise verstärken. Die Verwendung frisch isolierter Stämme könnte diesem Problem am ehesten begegnen, was bei der vorliegenden Studie aus technischen Gründen leider nicht möglich war.
Die vorgesehenen Studien erforderten ein Kulturfiltrat, welches außer den extrazellulären Stoffwechselprodukten möglichst frei von Proteinen sein sollte. Aus diesem Grunde bedurfte es eines von Makromolekülen befreiten Nährmediums. Chemisch definierte Nährmedien mußten ausscheiden, weil in ihnen lediglich ein Minimalwachstum zu erwarten war. Dagegen ist bekannt, daß sich die Zugabe von Peptiden in Form von Fleischextrakten, wie sie z.B. in der THB vorliegen, positiv auf das Wachstum der Stämme und v.a.auf deren Bil-

dung von extrazellulären Produkten auswirkt (42,57,59).
Die Verwendung von dialysierter THB erschien hier daher am ehesten geeignet, der Forderung nach einem eiweißfreien Medium einerseits und andererseits nach einem Medium, das eine ausreichende Bildung von extrazellulären Produkten erwarten ließ, gerecht zu werden.
Ein weiteres Problem stellt die Länge der Inkubationszeit dar. Da mehrere Enzyme analysiert werden sollten, mußte mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden ein Kompromiß eingegangen werden, obgleich das Inkubationsoptimum für SLO um 16, für Sk 24 und für Hyase 36 bis 48 Stunden beträgt (10,14,25). Da jedoch die Bedingungen für alle Stämme gleich waren, können zwar keine absoluten Aussagen gemacht werden, ein Vergleich der Stämme bleibt dagegen möglich.
Als zusätzlicher kritischer Punkt muß die hochgradige Einengung der Überstände angesehen werden, wobei die Enzyme je nach Empfindlichkeit unterschiedlich davon betroffen waren. Mit Substanzverlusten und Minderung der Enzymaktivität muß bei den erforderlichen Vorgängen gerechnet werden. Dies gilt insbesondere für SLO, bei dem die Untersuchungen eine erstaunlich geringe Aktivität ergaben, was im Widerspruch zu der Vorstellung steht, daß bei Infektionen mit humanpathogenen Streptokokken immer Anti-SLO-Antikörper nachgewiesen werden können.
Die Reproduzierbarkeit der Verfahren wurde an 6 Stämmen (A 37636, A 23618,B 23943,G 15042,G 16906,G 17586) überprüft, die bei der ersten Analyse hohe enzymatische Aktivitäten gezeigt hatten. Dabei ergab sich bei der Reproduktion, daß in allen 3 Analyseverfahren nur geringe Unterschiede hinsichtlich der enzymatischen Aktivitäten bzw. der Stärke der Banden im Vergleich zur ersten Analyse zu verzeichnen waren, die darauf zurückgeführt werden können, daß die Einengung technisch bedingt nur annähernd 600fach durchgeführt werden konnte.
In Anbetracht der obengenannten nicht vermeidbaren Risiken sollten hauptsächlich zwei Fragen beantwortet werden: 1.Lassen sich

mit den gewählten Analyseverfahren unterschiedliche Eigenschaften von Streptokokkenstämmen darstellen? 2.Bestehen neben den individuellen Unterschieden gruppenspezifische Gemeinsamkeiten?
Die erste Frage läßt sich anhand der Ergebnisse der Enzymnachweise positiv beantworten. Die stammbezogenen Unterschiede erscheinen z.T.sowohl qualitativ als auch quantitativ so erheblich, daß ihre klinische Signifikanz nicht auszuschließen ist. Weitere Studien in dieser Richtung mittels Stämmen, bei denen nur ein bestimmtes Enzym in ausreichend hoher Aktivität nachgewiesen werden konnte, wie dies bei etlichen B-Stämmen für DNAse der Fall war, erscheinen im Hinblick auf die Präparation eines bestimmten Enzyms interessant und erfolgversprechend. Die enzymatischen Untersuchungen haben ferner zur Entdeckung von Stämmen (A 22815,23980,22526)geführt,die nur DNAse, jedoch keine NADase produzieren. Da NADase im I.E.F. die DNAse B überlagert(40), wären diese Stämme zur Präparation von DNAse B im I.E.F. geeignet.
Technisch weniger aufwendig und damit in der Routinediagnostik besser durchführbar wäre eine Charakterisierung mittels I.E.F. .
Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Enzymaktivität durch die Trennung nicht beeinträchtigt wird (40). Damit dürften die Voraussetzungen für eine enzymspezifische Charakterisierung bestimmter Banden, die nicht Gegenstand dieser Arbeit ist ,gegeben sein. Allerdings haben sich die Hinweise dafür vermehrt, daß einzelne Banden aus mehreren Komponenten mit weitgehend übereinstimmenden isoelektrischen Punkten bestehen, sodaß Schwierigkeiten hinsichtlich einer korrekten Zuordnung im Sinne eines bestimmten Enzymnachweises nicht ausgeschlossen sind.
Die SDS-PE zeigt, wie die Vielzahl von Banden aufweist, eine grössere Trennschärfe und damit bessere Eignung, auch geringfügige Unterschiede in den Stoffwechselleistungen einzelner Streptokokkenstämme zu dokumentieren. Eine Zuordnung Bande-Enzym wird in diesem Falle jedoch nur durch die Untersuchung hochgereinigter Enzympräparate möglich sein, weil die Enzyme durch die Vorbehandlung denaturiert werden und damit nach der Trennung einem enzymatischen Nachweis nicht mehr zugeführt werden können.

In der Literatur finden sich bezüglich der isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte z.T.unterschiedliche bzw.widersprüchliche Angaben. So ermittelten Bernheimer und Reitz(7) für SLO ein Mol.-Gew.von 60000 D, Alouf(2) dagegen 55000 D bzw. 110000 D . Noch unterschiedlicher sind die Ergebnisse im I.E.F.,wo Bernheimer(7)pI-Werte von 5,8 ,6,5 und 7,5 , Alouf(2) 6,5 und 7,2 , Fehrenbach(40) für Gruppe A 6,1 ,7,2 und 7,6 , für Gruppe C 6,0 und 7,5 angeben. Die Ergebnisse zur NADase von Grushoff(19,37) und Fehrenbach(12) stimmten bezüglich des Mol.-Gew.mit 55000 D bzw. 56000 D gut überein. Zum pI-Wert der NADase liegen nur die Ergebnisse von Fehrenbach(40)für Gruppe A mit 8,4 und 8,9 , für Gruppe C mit 8,3 und 8,6 vor.

Bezüglich des Mol.-Gew.der Streptokinase fanden Fehrenbach 47000 D, Gerlach und Köhler(15) 45000 D. Für den pI der Streptokinase ermittelte Fehrenbach 5,4(Gr.C) und 5,8(Gr.A), während Köhler mehrere Werte von 5,05 bis 6,5 angibt.

Gray(17) stellte für die DNAsen Mol.-Gew.von 25-30000 D fest, Fehrenbach fand bei Gr.A pI-Werte von 5,8(DNAseA), 9,0(DNAseB), 4,4 (DNAseC) und 7,9(DNAseD) bzw.bei Gr.C 5,6(DNAseA) und 4,3(DNAseC). Die Tatsache, daß Hill(21)für die Hyase(5,6) ca.50000 D mittels SDS-PE, 70000 D mittels Gelfiltration, Gerlach(13) 75000 D mittels Gelfiltration feststellten, zeigt deutlich, daß die Ergebnisse auch wesentlich von der Methodik abhängen. Für den pI der Hyase waren Werte von 5,0 bei Gerlach(13) bzw.4,4(Gr.A) und 4,3(Gr.C) bei Fehrenbach(40) zu finden.

Weitere Angaben zu anderen Exotoxinen finden sich in der Literatur für Streptolysin-S(22),das sog.pyrogenic exotoxin(4), ein extrazelluläres Blastogen(18), ein spezifisches extrazelluläres Produkt bei akuter Glomerulonephritis(33,55), das erythrogene Exotoxin bei Scharlach(24) und für die Proteinase(28).

Versucht man die Vielzahl der Banden in den elektrophoretischen Verfahren, die zunächst im Widerspruch zur Zahl der bekannten Enzyme steht, zu erklären, so muß berücksichtigt werden, daß bedingt durch Mutationen mehrere Isoenzyme und Varianten eines Enzymes möglich sind. Unklar ist natürlich auch, ob alle bzw.wieviele

Banden enzymaktive Komponenten repräsentieren. Als gesichert kann lediglich gelten, daß die dargestellten Proteine nicht aus dem Nährboden stammen, was aus den in der SDS-PE und im I.E.F.mehrfach mitgeführten Leerwerten(unbeimpften Nährboden-Konzentraten) eindeutig hervorging.

In diesem Zusammenhang sind die mit x gekennzeichneten Stämme von Interesse. Im Enzymtest nur gering aktiv zeigen sie in den elektrophoretischen Verfahren doch eine erhebliche, wenn auch v.a.im IEF vergleichsweise geringe Anzahl von Banden. Von Liu e.a.(28)wurde eine von bestimmten Streptokokkenstämmen gebildete Proteinase beschrieben, die den Widerspruch in den obengenannten Ergebnissen in der Weise erklären würde, daß hier Spaltprodukte und Aggregatbildungen von vormals aktiven Enzymen vorliegen, die durch die Proteinase zerstört und inaktiviert wurden. Da die Proteinase auch die Hyase zerstört, können diese Stämme Hyaluronsäure-haltige Kapseln ausbilden, wie dies bei 7 x-Stämmen der Fall war, die sich durch stark schleimiges Wachstum auszeichneten. In der SDS-PE findet man bei allen x-Stämmen die Banden 32 und 45, was mit den Ergebnissen von Liu, der für die inaktive Form ein Mol.-Gew.von 44 x 10^3D und für die aktive Form ein Mol.-Gew.von 32 x 10^3D ermittelt hatte, gut korrelieren würde. Auffällig war das Verhalten der Doppelbande 45-49 insofern, als bei geringfügig besserer enzymatischer Aktivität des Stammes die Bande 49 schwächer ausgeprägt war, was dafür sprechen würde, daß sich die aktive Form in Bande 49 manifestiert. Welcher biologische Sinn sich hinter der Proteinasebildung und der damit verbundenen geringeren enzymatischen Aktivität und Virulenz verbirgt, ist noch ungeklärt.

Obwohl es keinen Anhalt dafür gibt, daß die zur Serogruppen-Zuordnung maßgeblichen Substrate für die Toxinbildung von Bedeutung sind, finden sich in allen drei Verfahren Hinweise auf gruppenspezifische Enzymmuster, deren statistische Absicherung derzeit noch nicht möglich ist. Allgemein zeigen die Stämme im I.E.F.gruppenspezifischere Merkmale und Muster als in der SDS-PE, in der auch über die Serogruppe hinaus Gemeinsamkeiten auftreten. Dies würde

wiederum die Annahme stützen, daß von einem Enzym mehrere gruppenspezifische Isoenzyme und Varianten existieren, die sich zwar nicht in ihrem Mol-Gew., jedoch bezüglich des pI voneinander unterscheiden.

Bei der Serodiagnostik von Streptokokkeninfektionen haben sich im Laufe der letzten Jahre Hinweise dafür ergeben, daß neben der Anti-SLO-Bestimmung auch der Anti-DNAse-B-Nachweis zweckmäßig ist(58). Diese Erkenntnis findet Unterstützung in den Ergebnissen des direkten Enzymnachweises: Bei den meisten Stämmen ist die Bildung von DNAse vorherrschend und stärker ausgeprägt als die Bildung von SLO, wobei nicht außer acht gelassen werden sollte, daß es sich hier um in-vitro-Untersuchungen handelt, bei denen die Bedingungen für SLO sicher nicht optimal waren(s.o.) und die immunogene Potenz eines Enzyms unberücksichtigt bleibt.

Insgesamt berechtigen die hier vorgelegten Ergebnisse zur Annahme, daß über eine Analyse der Exotoxine Einblick in die Eigenschaften von Streptokokkenstämmen gewonnen werden können, die sowohl aus bakteriologisch-wissenschaftlicher als auch klinisch-diagnostischer Sicht über die Serotypisierung hinaus zur Charakterisierung von Bedeutung sind. Weitere Studien mit verbesserten Methoden erscheinen erfolgversprechend. Insbesondere wäre zu klären, ob durch das Angebot isotopenmarkierter Bausteine für die Exotoxinsynthese die Bedingungen für die Anzüchtung in der Weise erleichtert werden können, daß ein nicht-dialysiertes Medium angewendet werden könnte, und die Einengung der Kultursubstrate ganz oder doch weitgehend entbehrlich würde.

Erstrebenswertes Ziel ist es, die Banden in den elektrophoretischen Verfahren bestimmten Enzymen zuzuordnen und zu identifizieren, um Aussagen von klinischer Bedeutung sowohl bezüglich der Korrelation von Toxinbildung in-vitro und Antikörperbildung in-vivo, als auch betreffend der Prognose einer Infektion machen zu können.

5. Zusammenfassung

Die Kulturfiltrate von 54 Stämmen beta-hämolysierender Streptokokken, darunter 10 A-, 15 B-, 8 C- und 18 G-Stämme, wurden mittels enzymatischer und elektrophoretischer Verfahren(Isoelectrofocusing und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) analysiert.
Die Enzymanalyse, bei der DNAse,NADase,Streptokinase,Streptolysin O und Hyaluronidase nachgewiesen wurden, ergab z.T.erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede mit gruppenspezifischen Auffälligkeiten.
Mit Hilfe der SDS-PE wurden insgesamt 39 Banden mit einem Molekulargewichtsspektrum von 17000 D bis 150000 D gefunden, die für die einzelnen Serotypen charakteristische Muster bildeten, obgleich hier mehr gruppenüberschneidende Bandenkonstellationen anzutreffen waren als im I.E.F. .
Im I.E.F.waren 23 Banden in einem pH-Bereich von 3,6 bis 8,7 zu unterscheiden, wobei die Bandenmuster innerhalb der Serogruppen recht einheitlich waren.
In diesem Zusammenhang waren 11 Stämme aus unterschiedlichen Serogruppen interessant, die nur minimale enzymatische Aktivität, in der SDS-PE und im I.E.F. jedoch charakteristische Muster zeigten. Dabei konnten Beziehungen zu der von LIU e.a.beschriebenen Proteinase hergestellt werden, die die Diskrepanz von Enzymaktivität und Elektrophorese-Muster erklären können.
Alle drei Verfahren erscheinen geeignet, bestimmte Eigenschaften von Streptokokkenstämmen und deren extrazellulärer Produkte hinsichtlich der enzymatischen Aktivität bzw.des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes der Enzyme zu charakterisieren.
Die Aussagen müssen jedoch insofern eingeschränkt werden, als es sich um in-vitro-Bedingungen handelt, die Kompromisse bezüglich der Züchtungsbedingungen und der Gewinnung der Exoenzyme notwendig machten.
Wünschenswert wären empfindlichere Modifikationen der Methoden unter Verwendung von radioaktivem Material z.B., bei denen sich die Verwendung von dialysiertem Nährmedium und die Konzentrierung der Kul-

turfiltrate erübrigten.

Da nicht nur Zellwandbestandteile, sondern auch in hohem Maße Stof wechselprodukte maßgebliche Pathogenitätsfaktoren darstellen, ist eine serotyp-unabhängige Charakterisierung humanpathogener Stämme sicherlich von klinischer Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

1. Alouf,J.E.,Raynaud,M.: Nouvelle methode de la purification de la Streptolysin O.
   C.R.Acad.Sci.Paris 264 D(1967)2524
2. Alouf,J.E.,Raynaud,M.: Purification and some Properties of Streptolysin O.
   Biochimie 55(1973) 1187-1193
3. Arvilanni,H.: Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci by using Coagglutination, Precipitation or Bacitracin sensitivity.
   Acta path.microbiol.scand.B 84(1976)79-84
4. Barsumian,E.L.: Heterogenity of Group-A-Streptococcal Pyrogenic Exotoxin Type B.
   Infec.Immun.20(2)(1978)512-518
5. Benchetrit,L.C.,Gray,E.D.,Edstrom,R.D.,Wannamaker,L.W.: Purification and Characterisation of a Hyaluronidase associated with a Temperate Bacteriophage of Group A,Type 49 Streptococci.
   J.Bact.134,1(1978) 221-228
6. Benchetrit,L.C.,Gray,E.D.,Wannamaker,L.W.: Immunological Properties of Hyaluronidase associated with Temperate Bacteriophages of Group-A-Streptococci.
   J.Exp.Med.149,1(1979)73-83
7. Bernheimer,A.W.: Hemolysins of Streptococci: Characterization and Effects on Biological Membranes.
   In: Wannamaker and Matsen: Streptococci and Streptococcal Diseases. New York, Academic Press 1972.
8. Böszörményi,J.: Simplified Method for the Routine Determination of Antistreptokinase Titre.
   Z.Immunitätsforschung 124(1962)411-418
9. Bradford,M.: A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding.
10. Christensen,L.R.: Streptococcal Fibrinolysis: A Proteolytic Reaction due to a Serum Enzyme activated by Streptococcal Fibrinolysin. J.clin.Invest. 28(1949)163

11. Faber,V.: Streptococcal Hyaluronidase.
Acta path.Microbiol.Scand. 31(1952) 345

12. Fehrenbach,F.J.: Gel-Filtration Behaviour and Molecular-Weight of a NAD-Glycohydrolase from Streptococci in Column Chromatography on Sephadex gels.
J.Chromatogr.41(1969)43-52

13. Gerlach,D.,Köhler,W.: Hyaluronatlyase von Streptococcus pyogenes.
I.Bildung und Isolierung.
II.Charakterisierung der Hyaluronatlyase.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 221(1972)166-172 u.296-302

14. Gerlach,D.,Köhler,W.: Untersuchungen zur Heterogenität von Streptokinasen verschiedener Herkunft.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 238(1977)336-349

15. Gerlach,D.,Köhler,W.: Untersuchungen zur Heterogenität von Streptokinasen.II.Mitteilung:Aminosäurenzusammensetzung und serologische Aktivität.III.Mitteilung:Aggregatbildung bei Streptokinasen.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 244(1979)210-221 u.222-228

16. Ginsburg,I.: Mechanisms of cell and tissue injury by Group A Streptococci: Relation to a poststreptococcal sequelae.
J.Infect.Dis.126(1972)294

17. Gray,E.D.: Nucleases of Group A Streptococci.
In: Wannamaker and Matsen: Streptococci and Streptococcal Diseases. New York 1972 Academic Press.

18. Gray,E.D.: Purification and Properties of an Extracellular Blastogen produced by Group A Streptococci.
J.Exp.Med.149,6(1979)1438-1449

19. Grushoff,P.S.,Shany,S.,Bernheimer,A.W.: Purification and Properties of Streptococcal Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase.
J.Bact. 122(1975)599

20. Heymer,B.: Pathogenitätsfaktoren beta-hämolysierender Streptokokken. Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 227(1974)150-158

21. Hill,J.: Purification and Properties of Streptococcal Hyaluronat Lyase. Infec.Immun.14(1976)726-735

22. Hryniewicz,W.,Gray,E.D.,Tagg,J.R.,Wannamaker,L.W.: Streptolysin S: Purification and Properties.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 242,3(1978)327-338

23. Jawetz,Melnick,Adelberg: Die Streptokokken.
In: Medizinische Mikrobiologie. 1977(4.Aufl.) Springer Verl.

24. Kim,Y.B.,Watson,D.W.: Streptococcal Exotoxins: Biological and Pathological Properties.
In: Wannamaker and Matsen: Streptococci and Streptococcal Diseases. New York 1972 Academic Press.

25. Köhler,W.: Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektionen.In: Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie,v. Habs und Kathe, Leipzig 1963 Barth.

26. Lämmli,U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature 227(1970)680-684

27. Lancefield,R.C.: A Serological Differentiation of Human and other Groups of Hemolytic Streptococci.
J.Ecp.Med.57(1933)571-594

28. Liu,T.Y.,Neumann,N.,Elliott,S.,Moore,S.,Stein,W.: Chemical Properties of Streptococcal Proteinase and its Zymogen.
J.Biol.Chem.238(1963)251-256

29. Lowry,O.,Rosebrough,N.,Farr,L.,Randall,R.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J.Biol.Chem.193(1951)265

30. Lütticken,R.u.D.,Johnson,D.,Wannamaker,L.W.: Application of a New Method for Detecting Streptococcal Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase to Various M Types of Streptococcus pyogenes.
J.Clin.Microbiol.5(1976)533-536

31. Mosimann,J.,Brunner,P.: Gruppierung beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppen A,B,C,G mit dem Phadebact Streptococcus Test. Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 245(1979)25-32

32. Patterson,M.J.,Hafeez,A.: Group B Streptococci in Human Disease.
Bact.rev.40(1976)774-792

33. Potter,E.,Moran,A.: Extracellular Factors, Blood Group Antigens and Bacteriophage of Nephritogenic and Nonnephritogenic Strains of Type M12 Streptococci.
J.Infec.Dis.Vol.140(3)392-396

34. Preac-Mursic,V.: Vergleichende Untersuchungen zur Differenzierung beta-hämolysierender Streptokokken.
Persönl.Mitteilung,im Druck.

35. Radola,B.J.,Graesslin,D.: Electrofocusing and Isotachophoresis.
Proceedings of the International Symposium 1976 in Hamburg
Berlin and New York 1977 De Gruyter Verlag.

36. Rosner,R.: Clinical Evaluation of a Rapid Four Hour Serological Grouping of Groups A,B,C,G Beta Streptococci using the Phadebact Streptococcus Test.
J.Clin.Microbiol.6(1977)23-26

37. Shany,C.J.,Grushoff,Ph.,Bernheimer,A.: Physical Separation of Streptococcal Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase from Streptolysin O.
Infec.Immun.5(1973)731-734

38. Slifkin,M.,Engwall,C.,Pouchet,G.: Direct-Plate Serological Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci from Primary Isolation Plates with the Phadebact Streptococcus Test.
J.Clin.Microbiol.7(1978)356-360

39. Smyth,C.J.,Arbuthnott,J.P.: Properties of Clostridium perfringens Alpha-Toxin purified by Electrofocusing.
J.Med.Microbiol.7(1974)45

40. Smyth,C.J.,Fehrenbach,F.J.: Isoelectric Analysis of Haemolysins and Enzymes from Streptococci of Groups A,C and G.
Acta path.microbiol.scand.Sect.B 82(1974)860-870

41. Spector,Th.: A Sensitive Protein Assay.
Anal.Biochem.86(1978)142

42. Stock,A.H.: Studies on the Hemolytic Streptococcus. I.Isolation and Concentration of Erythrogenic Toxin of the NY5 Strain of Hemolytic Streptococcus.
J.Immunol.36(1939)489

43. Stoner,R.A.: Bacitracin and Coagglutination for Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci.
J.Clin.Microbiol.7(1978)463-466

44. Tiesler,E.,Beck,U.: Die Verteilung der Isoenzyme der Nukleasen bei A-Streptokokken.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 234(1976)462-472

45. Tiesler,E.,Zolfaghari,I.: Der Antistreptodornase-B-Titer.
Ärztl.Lab.19(1973)267-272

46. Tiesler,E.,Merklen,K.: Die initialen Phasen einer Infektion mit beta-hämolysierenden Streptokokken der Gr.A beim Kaninchen unter bes.Berücksichtigung der Streptodornase und der Anti-Streptodornase.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 226(1974)48-54

47. Tiesler,E.,Rummler,A.,Kordovic,Chr.: Grundlagen der Anti-NADase-Reaktion bei A-Streptokokken-Infektionen und deren Durchführung als Mikrotitertest.
Immun.Infekt.4(1977)157-162

48. Tiesler,E.,Trinks,U.: Die Streptolysin-O-Bildung beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppe A.
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A 245(1979)17-24

49. Tillett,W.S.,Garner,Ph.D.: The Fibrinolytic Activity of Hemolytic Streptococci.
J.Exp.Med.58(1933)485

50. Todd,E.W.: Antigenic Streptococcal Hemolysin.
J.Exp.Med.55(1932)267

51. Todd,E.W.: The Hemolysin produced by Streptococci in Serum Media as an Antigen and its Effect by Antistreptolysin in vitro.
J.Path.Bact. 36(1933)435

52. Topley,W.W.C.,Wilson,G.S.,Miles,A.A.: The Streptococci.
In: Principles of Bacteriology,Virology and Immunity.
London 1975 Verl.E.Arnold.

53. Vesterberg,O.,Wadström: Studies on Extracellular Proteins from Staph.Aur.:V.Separation and Characterization of Enzymes and Toxins by Isoelectric Focusing.
Biochim.Biophys.Acta 168(1967)228-242

54. Vesterberg,O.: Isoelectric Focusing and Separation of Proteins.
In: Norris , Methods in Microbiology,Vol.5B.
London and New York 1971 Academic Press

55. Villareal,H.: Occurence of a Protein in the Extracellular Products of Streptococci isolated from Patients with Akute Glomerulonephritis.
J.Exp.Med.149,2(1979)459-472

56. Weber,K.,Osborn,M.: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J.Biol.Chem.244(1969)4406

57. Wannamaker,L.W.: The Differentiation of Three Distinct DNAses of Group A Streptococci.
J.Exp.Med.107(1958)797

58. Wannamaker,L.W.: The Extracellular Products of Group A Streptococci.
In: Wannamaker, Streptococcal Diseases and the Immune Response. New York 1980 Academic Press.

59. Wooley,Ph.D.: A New Growth Factor required by certain Hemolytic Streptococci.
J.Exp.Med.73(1941)487

Herrn Prof.Dr.Schierz danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung.
Frau Dr.Wilske,Frau Dr.Preac-Mursic sowie Frl.v.Busch, Frl.Pfadler und Frl.Schmidt möchte ich für ihre bereitwillige Hilfe und Beratung danken.

Lebenslauf

Am 27.6.1955 wurde ich als erstes Kind des Otto-Friedrich Weber, Dekan, und seiner Frau Brigitte geb.Brunner in TÜbingen geboren. Zusammen mit meiner Schwester wuchs ich in Schelklingen auf und besuchte dort die Grundschule. Im Jahre 1966 wechselte ich an das Gymnasium Ehingen/Donau, an dem ich 1974 die ReifeprÜfung ablegte. Anschließend leistete ich von 1974 bis 1976 meinen Wehrdienst in Koblenz und Stuttgart ab. Im Sommersemester 1976 nahm ich an der Julius-Maximilians-Universität WÜrzburg das Medizinstudium auf, absolvierte dort 1978 das Physikum und ein Jahr später den 1.Teil der Ärztlichen PrÜfung. Danach setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität MÜnchen fort. Hier begann ich 1979 mit der Dissertationsarbeit am Max von Pettenkofer-Institut. 1980 heiratete ich Almut WÜlfing. Seit 1981 wohnen wir in Kirchentellinsfurt bei TÜbingen, wo auch unser Sohn Aurelius geboren wurde. Im Sommer 1981 legte ich den 2.Teil der Ärztlichen PrÜfung in MÜnchen ab und trat danach das Praktische Jahr am Diakonie-Krankenhaus Schwäbisch Hall, Lehrkrankenhaus der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,an. Im Oktober 1982 bestand ich in Schwäbisch Hall und Heidelberg den 3.Teil der Ärztlichen PrÜfung und erwarb damit die Approbation als Arzt. Ab 1983 bin ich als Assistenzarzt auf der Abteilung Innere Medizin des Kreiskrankenhauses Rottweil tätig.